

jp2000083695/pn

L1 ANSWER 1 OF 1 JAPIO COPYRIGHT 2003 JPO
ACCESSION NUMBER: 2000-083695 JAPIO
TITLE: PRODUCTION OF LOW-BITTER PEPTIDE
INVENTOR: KODERA TOMOHIRO; ASANO MINAO; MIWA TETSUYA; NIO NORIKI
PATENT ASSIGNEE(S): AJINOMOTO CO INC
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC

JP 2000083695	A	20000328	Heisei	C12P021-06

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT: JP 1998-261175 19980916
ORIGINAL: JP10261175 Heisei
PRIORITY APPLN. INFO.: JP 1998-261175 19980916
SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN (CD-ROM), Unexamined
Applications, Vol. 2000
INT. PATENT CLASSIF.:
MAIN: C12P021-06
SECONDARY: A23L001-227; C07K001-12

ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a low-bitter peptide useful in e.g. foods, medical foods, seasonings, etc., without the need of any bitter-mitigating operation by making an endopeptidase having such substrate specificity as to be low in the activity to cleave the terminal of a hydrophobic amino acid act on a protein.

SOLUTION: This low-bitter peptide is obtained without the need of any special bitter-mitigating technique by the following procedure: an endopeptidase such as germinated soybean enzyme cysteine protease D3, having such substrate specificity as to be low in the activity to cleave the terminal of a hydrophobic amino acid, is added to a protein such as a separated soybean protein solution followed by adjusting the system to pH 4.5 and allowing the system to react at 37deg;C for 24 h; after ending the reaction, the system is treated under heating at 100deg;C for 15 min to deactivate the enzyme followed by centrifugal separation to collect the resulting supernatant fraction, which is then neutralized to about pH 7 with NaOH and lyophilized. This low-bitter peptide is useful in various fields including foods, enteral nutrients, medical foods, seasonings, flavor improvers food property improvers, food additives and feed.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-83695
(P2000-83695A)

(43) 公開日 平成12年3月28日(2000.3.28)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 P 21/06		C 1 2 P 21/06	4 B 0 4 7
A 2 3 L 1/227		A 2 3 L 1/227	B 4 B 0 6 4
C 0 7 K 1/12		C 0 7 K 1/12	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平10-261175

(22) 出願日 平成10年9月16日(1998.9.16)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 小寺 智博

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社食品総合研究所内

(72) 発明者 浅野 皆夫

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社食品総合研究所内

(74) 代理人 100059959

弁理士 中村 稔 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 低苦味ペプチドの製造法

(57) 【要約】

【課題】 特別な苦味低減法を必要とせず、低苦味ペプチドを製造する方法を提供すること。

【解決手段】 疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼを蛋白質に作用させることを特徴とする低苦味ペプチドの製造法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼを蛋白質に作用させることを特徴とする低苦味ペプチドの製造法。

【請求項2】 疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼが、発芽ダイズ酵素システインプロテアーゼD3である請求項1記載の低苦味ペプチドの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】本発明は、低苦味ペプチドの製造法に関し、更に詳細には、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低いエンドペプチダーゼを用いて、苦味低減操作を必要とせず、酵素分解の単独の操作で苦味の弱いペプチドを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】食品蛋白質の特性を修飾する目的で種々の蛋白質分解酵素が利用されている。その結果得られるペプチドは各種の機能特性を有しており、目的に合わせて様々に利用されている。例えば、HVP、HAPと比較して遊離アミノ酸が少ないため、マイルドな呈味性を利用した調味料素材として利用されている。栄養素材としては、ペプチド態の方がアミノ酸単体と比較して速やかに吸収され、分枝鎖アミノ酸の吸収にも優れている。さらにトウモロコシ蛋白質のように消化しにくい場合であってもペプチドに分解することで消化吸収の良い栄養素として利用できる。また、ペプチド態とすることにより、蛋白質と比較して、広範囲のpHでの溶解性向上、粘性低下、吸湿性・保湿性向上、乳化性、気泡性、ゲル化性が改変され、食材としての優位性が生じる。さらに、ダイズ蛋白質分解ペプチド等が、血中コレステロール低下作用、コレステロール吸収阻害、胆汁酸結合能、血小板凝集抑制作用、抗酸化作用等の生理作用を有することも報告されている。また蛋白質を低分子化することでアレルギー性が低下ないし消失することも明らかとなっている。

【0003】蛋白質分解ペプチドはこのように優れた機能、特性を有するものであるが、特有の苦味を有しているため、食品への利用が制約されているのが現状である。そのため苦味低減の手法として疎水性アミノ酸残基を特異的に切断するペプチダーゼにより苦味を除去する方法（特開平7-274995号公報）などが知られているが、遊離アミノ酸が増加してしまうという問題がある。基質蛋白質を限定する方法（特開平5-344847号公報、特開平10-23863号公報）も知られているが、適用範囲が狭まってしまう。さらに苦味マスキング剤の使用（特開平9-162号公報、特開平9-100297号公報）や、苦味ペプチドを分画・除去する方法（特開平5-244978号公報）や、プラステイン反応による高分子化（J. Agric. Biol. Chem. 34,1484(1970)）、包接化合物の利用（特開平2-283246

号公報）等も知られている。しかしいずれの方法も、ペプチド本来の機能が失われたり、回収率の低下、特殊な設備が必要、コスト高を招くなどの種々の問題点を有している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って本発明の目的は、従来技術の上記問題点を伴うことなく、苦味の弱いペプチドを製造する方法を提供することである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼを蛋白質に作用させることを特徴とする低苦味ペプチドの製造法を提供するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明者は、上記課題を解決するためにペプチドの苦味発現機構に注目した。即ち、現在用いられているエンドペプチダーゼは疎水性アミノ末端を選択的に切断する基質特異性を有している。そのためこれらの酵素分解ペプチドのN末端、C末端には、疎水性アミノ酸が存在する確率が高い。しかも、これら苦味を有するペプチドを疎水性アミノ酸に特異的なペプチダーゼで処理すれば苦みが消失することが知られている。従って、ペプチドの苦味はペプチド末端に疎水性アミノ酸が存在することが原因と考えられる。そこで本発明者は、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼを蛋白質に作用させれば、苦味低減処理を必要とすることなく低苦味ペプチドが得られるのではないかと考え、研究を進めた結果、本発明を完成するに至ったものである。

【0007】本発明に使用する疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼは、分解ペプチドのC末端、N末端に疎水性アミノ酸が存在する確率が低くなる切断傾向を有するエンドペプチダーゼである。従って、このような基質特異性を有するエンドペプチダーゼを用いて蛋白質を加水分解すれば、遊離アミノ酸量が少なく、苦味の弱い分解物が得られるのである。本発明においては、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼの少なくとも1種を使用する。また本発明においては、苦味低減処理を必要とせずに低苦味ペプチドを得るという目的が達成される限り、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼの少なくとも1種に、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼの少なくとも1種を併用してもよい。エンドペプチダーゼは、天然より分離したままの粗酵素でも、精製したものでも、また遺伝子組み換え体で発現させたものでも良い。

【0008】エンドペプチダーゼの疎水性アミノ酸末端を切断する活性は、例えば、以下の方法で測定することができるが、これに限定されるわけではない。

① 基質となるペプチドホルモン50mmolに対し、酵素を0.1重量%加え、至適pHに調整したバッファーに混合する。ペプチドホルモンとしては、酸化型インスリンB鎖、ニューロテンシン、グルカゴン、黄体形成ホルモン放出ホルモン等が使用できる。

② 至適温度で1時間反応させる。得られるペプチドの解析上、反応が不十分であったり、十分過ぎた場合は反応時間を適度に調節する。

③ 反応を蟻酸で停止し、C18逆相カラムで分離物を分離する(Aバッファーに0.1%TFA、Bバッファーに0.1%TFA含有CH₃CNを用い、流速1ml/分でBバッファーを10~100%のグラジエントで45分以上で溶出する)。分離されたペプチドをプロテインシーケンサー、マスマスペクトロメトリー、アミノ酸分析機等を用いた分析法で、アミノ酸配列を明らかにする。

④ 以上の方法で酵素の基質切断部位を測定し、疎水性アミノ酸部位で切断することが知られており、その分解ペプチドに苦味が生じるズブチリシン、サーモリシン、ペプシン、トリプシン、キモトリプシン等と同様の酵素分解パターンが認められる酵素を疎水性アミノ酸末端を切断する活性の高い酵素とする。

【0009】上記疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼの好ましい例としては、発芽ダイズ子葉中より得られる酵素システインプロテアーゼD3(チオールプロテアーゼD3)(特開平8-246号公報)、その組み換え体(特開平9-121870号公報)等が挙げられる。この酵素D3は分子量26~30KDaのエンドペプチダーゼで、疎水性アミノ酸のC末端に隣接する親水性アミノ酸のC末端側を切断する傾向が認められ、このような基質特異性を有するD3を用いて蛋白質を加水分解すれば、遊離アミノ酸量が少なく、苦味の弱いペプチド分解物が得られる。

【0010】本発明方法に使用される基質蛋白質に特に制限はなく、その好ましい例としては、大豆蛋白質、グルテン等の植物性蛋白質、カゼイン、ゼラチン、筋蛋白質、グロブリン、アルブミン等の動物性蛋白質が挙げられる。特に、食品として利用されている蛋白質を用いることが好ましい。本発明方法では、基質蛋白質として、1種類のみを使用してもよく、複数種類の混合物を使用してもよく、さらには分離大豆蛋白質のように蛋白質以外の物質(例えば、糖、食物繊維)を含んでも良い。

【0011】酵素分解により得られるペプチドの平均分子量は、4-ニトロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(NBD-F)試薬(K. Imai, Y. Watanabe, Anal. Chem. Acta., 130, 377-383 (1983))によりアミノ態・イミノ態窒素量を定量し(特開平6-264号公報)、NBD-F測定値と分析に供した分解物の濃度から求めた。

【0012】酵素分解後に得られるペプチドの分子量範

囲は、200~8000、望ましくは200~5000、さらに望ましくは200~2000である。一方、酵素分解により得られるペプチド中に共存する遊離アミノ酸含有量は、好ましくは10重量%以下、さらに好ましくは5重量%以下が望ましい。このようなペプチドを得るには、疎水性アミノ酸末端を切断する活性が低い基質特異性を持つエンドペプチダーゼを、蛋白質100重量部に対して0.01~1重量部使用し、30~45℃で、1~100時間程度処理すればよい。こうして得られる蛋白質分解ペプチドの苦味は、後述する苦味評価に従った等価濃度で、好ましくは0.05%以下、更に好ましくは0.04%以下、最も好ましくは0.02%以下である。

【0013】

【実施例】以下、本発明を実施例に従って説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0014】

【参考例】以下の実施例では、特開平9-121870号公報記載の組み換え体プロテアーゼD3のC末端側に新たに6アミノ酸残基(Cys, Asp, Asn, Tyr, Try, Ser)を付加し、天然に存在するD3と同じ、全長が247アミノ酸からなる組み換え体プロテアーゼD3(以下「rD3」という)を使用した。また、この組み換え体の製造においては、大腸菌でのrD3発現量を増加させるため、プロモーターとして、トリプトファン欠乏で容易に転写が誘導されるtrpプロモーターを使用した。以下、rD3の製造法を説明する。

(1) 形質転換体の作製と培養、封入体の調製

コンピテントセル法によりrD3遺伝子を組み込んだプラスミドをE.coli JM109に導入し、形質転換体を150 μg/mlのアンピシリンを含む寒天培地で選択した。形質転換体を150 μg/mlのアンピシリンを含む3 mlの2xYT培地に接種し、37℃で約10時間培養した。この前培養液1 mlを150 μg/mlのアンピシリンを含む50 mlのM9-カザミノ酸培地に移し、35℃で約20時間本培養を行った。培養終了後、遠心により集菌した菌体をA液(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)に懸濁し、超音波破碎した。これを、10000rpmで10分間遠心し、B液(A液+0.5% TritonX-100)で洗浄後、さらにA液で洗浄した。最終的に得られた画分を封入体とした。

(2) rD3の巻き戻し

上記の方法で調製した封入体を変性剤溶液(8mM尿素, 10mM DTT, 50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, pH8.0)に約20mg/mlの蛋白質濃度となるように溶解し、40℃で1時間インキュベートし、10000rpmで10分間遠心分離を行い上清を得た。巻き戻し液で平衡化した脱塩カラムPD-10(Sephadex G-25, Pharmacia Biotech)に封入体溶液2.5 mlを添加し、3.5 mlの巻き戻し液で溶出し、rD3の巻き戻しを行った。溶出液は、50mMリン酸カリウム, 5mM EDTA, 1mM グルタチオン(還元型), 0.1mMグルタチオン(酸化型), pH10.5を用いた。

(3) rD3の活性化

巻き戻したrD3はpro配列を有しており、非活性型である。蛋白質分解には以下の方法で予め活性化したrD3を用いた。巻き戻しrD3を50mM酢酸バッファーに5mg/ml程度になるよう混合し、37℃でインキュベートした。白濁消失後に分画分子量10kDaのウルトラフリー(MILLIPORE)で濃縮、脱塩した。蛋白質量を測定後、分解に用いた。

【0015】

【実施例1】分離大豆蛋白質溶液をpH4.5付近に塩酸で調整した。この分離大豆蛋白質溶液に活性体rD3を基質/酵素=500/1(重量比)となるように加え、37℃で24時間反応させた。反応終了後、100℃で15分間の加熱処理により酵素を失活させ、遠心分離で上清画分を得た。上清部分のpHをNaOHで中性付近に中和し、凍結乾燥により酵素分解ペプチドを得た。この分解ペプチド中に共存する遊離アミノ酸は5重量%以下であった。別に、活性体rD3の代わりに、ペプシン、またはアルカラーゼ(ノボノルディスク社製)をそれぞれの至適pHに調整した分離大豆蛋白質溶液に加え、基質/酵素=500/1(重量比)となるように加え、37℃で24時間反応させた。反応終了後、同様の方法で酵素分解ペプチドを得た。この分解ペプチド中に共存する遊離アミノ酸は5重量%以下であった。分解ペプチドの平均分子量を表1に示す。

【0016】

【表1】

酵素	平均分子量
rD3	1153
ペプシン	1256
アルカラーゼ	585

【0017】分解ペプチドの苦味評価は以下のように行った。まず、カフェインを0.00、0.02、0.04、0.06および0.08重量%となるように水に溶解した標準苦味液を調製し、各標準苦味液の苦味スコアをそれぞれ1(全く苦味なし)、2(殆ど苦味なし)、3(僅かに苦味がある)、4(苦味がある)および5(苦味が強い)とする。評価のパネル(6名)はあらかじめ訓練を行い、カフェインの苦味と濃度の識別が十分に行えるようにしておく。次に、分解ペプチドを所定濃度(この実施例では2重量%)となるように水に溶解し、各パネルは、このペプチド試料液の苦味をカフェイン標準苦味液と比較し、苦味が最も近い標準苦味液の苦味スコアをその試料液の苦味スコアとする。各パネルが与えたスコアの平均値を求め、これに対応するカフェイン濃度(等価濃度)を、各試料の苦味の指標とする。上記評価方法により得られた各試料の等価濃度を表2に示した。rD3分解ペプチドは他の酵素分解ペプチドと比較して有意に苦味が弱く、食品として十分に耐えうるものである。

【0018】

【表2】

酵素	等価濃度(%)
rD3	0.020
ペプシン	0.053*
アルカラーゼ	0.067*

* $p < 0.05$ でrD3分解物より有意に苦い

【0019】

【実施例2】酸カゼイン溶液をpH4.5付近に塩酸で調整した。分離大豆蛋白質溶液の場合と同様に活性体rD3を基質/酵素=500/1(重量比)となるように加え、37℃で24時間反応させた。反応終了後、100℃で15分間の加熱処理により酵素を失活させ、遠心分離で上清画分を得た。上清部分のpHをNaOHで中性付近に中和し、凍結乾燥により分解ペプチドを得た。この分解ペプチド中に共存する遊離アミノ酸は5重量%以下であった。別に、活性体rD3の代わりに、トリプシン、またはアルカラーゼをそれぞれの至適pHに調整した分離大豆蛋白質溶液に基質/酵素=500/1(重量比)となるように加え、37℃で24時間反応させた。反応終了後、同様の方法で酵素分解ペプチドを得た。この分解ペプチド中に共存する遊離アミノ酸は5重量%以下であった。得られた分解ペプチドの平均分子量を表3に示す。分解ペプチドを1重量%となるように水に溶解し、苦味評価を行った。表4に示したとおり、rD3分解ペプチドは有意に他の酵素より苦味が弱く、ペプチド素材としての優位性が示された。

【0020】

【表3】

酵素	平均分子量
rD3	1202
トリプシン	2096
アルカラーゼ	795

【0021】

【表4】

酵素	等価濃度(%)
rD3	0.020
トリプシン	0.053*
アルカラーゼ	0.073*

* $p < 0.05$ でrD3分解物より有意に苦い

【0022】

【発明の効果】本発明によって調製されたペプチドは、現在産業上用いられている酵素で調製されたペプチドと比較して苦味が弱く、非常に飲食し易く、アミノ酸の遊離も少ない。また蛋白質が本来有する栄養価を十分に利用することが出来る。従って、本発明によって調製されたペプチドは、食品、経腸栄養剤、医療食、調味料、風味改良材、食品物性改良材、食品添加物、飼料等多くの分野で用いられる。

フロントページの続き

(72)発明者 三輪 哲也
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社食品総合研究所内
(72)発明者 丹尾 式希
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社食品総合研究所内

Fターム(参考) 4B047 LB06 LE01 LG19 LG58 LP18
4B064 AG01 BA10 CA02 CA19 CA21
CC03 CC24 CD20 DA10
4H045 AA20 CA33 CA43 EA01 FA70
HA03